

# KEMAMPUAN MENGHAMBAT DAN SIFAT HAMBATAN ANALOG KURKUMIN TERHADAP AKTIVITAS ENZIM SIKLOOKSIGENASE

*The Inhibitory Potentiality and The Types of Inhibition of  
Curcumin Analogues on Cyclooxygenase Enzyme Activity*

Orbayinah, S<sup>1</sup>., Ismadi, M.<sup>2</sup>, dan Oetari<sup>3</sup>

*Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

## ABSTRACT

Curcumin analogues are compounds that were synthesized based on curcumin structure modified with substitution of dimethyl group at the two aromatic rings and C-a ketone cyclisation. The curcumin analogues employed were PGV-0 (Pentagamavunon-0), PGV-1 (Pentagamavunon-1) and HGV-1 (Heksagamavunon-1) with the respective molecule structures of  $C_{21}H_{20}O_5$ ,  $C_{23}H_{24}O_3$  and  $C_{24}H_{26}O_3$ .

The aim of this study was to find out the effect and the types of inhibition of curcumin analogues on cyclooxygenase enzyme activity. The experiments were performed using human platelets obtained from fresh human blood as a source of cyclooxygenase.

The inhibitory effect of cyclooxygenase was calculated as the percentage of inhibitions in the presence of 0,1,5,10,15,20  $\mu$ M of PGV-0 and 0,1,5,10,15  $\mu$ M of PGV-1 and HGV-1 in the final concentration. The concentration of the substrate was 3  $\mu$ M. The type of inhibition on cyclooxygenase was determined from the Lineweaver-Burk plots with a concentrations of 0,5,10,15 mM of PGV-0 and 0,5,10  $\mu$ M of PGV-1 and HGV-1. The concentration of the substrate were 1,3,5,7,9  $\mu$ M. Apparent  $K_i$  constants were calculated using the equation for competitive inhibition.

The results of this study showed that the three curcumin analogues have the inhibitory potentiality on cyclooxygenase enzyme activity in the order of potentiality respectively PGV-0 was smaller than PGV-1, and PGV-1 had about the same potency of HGV-1. The types of inhibition on cyclooxygenase activity for the three curcumin analogues were competitive.

**Keywords:** PGV-0 – PGV-1 –HGV-1 – cyclooxygenase

## PENGANTAR

Proses inflamasi merupakan reaksi tubuh terhadap masuknya benda-benda asing, invasi mikroorganisme atau kerusakan jaringan

1) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta

2) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

3) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

(Karnen, 1996). Proses ini diperantarai oleh banyak mediator kimia yang secara langsung maupun tidak langsung berperan dalam terjadinya inflamasi. Prostaglandin merupakan salah satu mediator inflamasi produk metabolisme asam arakhidonat yang diubah dengan diperantarai oleh enzim siklooksigenase (Vane dan Botting, 1995).

Telah banyak penelitian dilakukan terhadap kurkumin, kandungan utama *Curcuma longa* dan ternyata kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologis, diantaranya sebagai anti-inflamasi. Srimal dan Dhawan (1973) menunjukkan aktivitas kurkumin sebagai anti-inflamasi dengan menggunakan hewan uji tikus yang dibuat udem dengan diinjeksi karagenin. Kemampuan kurkumin sebagai anti-inflamasi melalui penghambatan enzim siklooksigenase yang berperan dalam proses metabolisme asam arakhidonat menjadi prostaglandin telah ditunjukkan oleh Dewhirst (1980). Kemampuan kurkumin sebagai anti-inflamasi melalui penghambatan enzim siklooksigenase dan enzim lipoksigenase yang berperan dalam proses metabolisme asam arakhidonat menjadi asam 5-hidroksieikosatetraenoat (5-HETE) maupun 8-HETE, telah diteliti oleh Huang, *et al.* (1991) dan Ammon, *et al.* (1993).

Analog kurkumin merupakan senyawa hasil sintesis berdasarkan struktur senyawa kurkumin, dengan melakukan modifikasi beberapa gugus fungsionalnya. Modifikasi yang dilakukan tersebut diharapkan menghasilkan senyawa baru yang mempunyai aktivitas biologis lebih kuat dan toksisitas yang lebih rendah.

Senyawa-senyawa yang diperoleh dari hasil modifikasi struktur kurkumin diantaranya adalah Pentagamavunon-0; (PGV-0);  $C_{21}H_{20}O_5$ , Pentagamavunon-1 (PGV-1),  $C_{23}H_{24}O_3$  dan Heksagamavunon-1 (HGV-1),  $C_{24}H_{26}O_3$ , (Sardjiman, 1997). Aktivitas biologis dari senyawa tersebut sudah pernah diteliti, diantaranya sebagai antioksidasi, anti-inflamasi, (Sardjiman, 2000) dan kemampuan menghambat enzim glutathione S-transferase (Tim Molnas, 2001). Penelitian lebih lanjut tentang aktivitas biologis senyawa tersebut belum banyak dilakukan, sehingga penulis ingin melakukan penelitian tentang senyawa tersebut terutama kemampuannya sebagai anti-inflamasi melalui kemampuan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase dan bagaimana sifat hambatannya.

Permasalahan yang diajukan adalah apakah senyawa analog kurkumin tersebut mempunyai kemampuan antiinflamasi melalui

Penelitian ini bertujuan membuktikan, bahwa senyawa analog kurkumin mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi melalui kemampuan menghambat enzim siklooksigenase, dan mengetahui sifat dari hambatan tersebut.

Inflamasi merupakan reaksi tubuh terhadap masuknya benda asing, invasi mikroorganisme atau kerusakan jaringan (Karnen, 1996). Inflamasi melibatkan rangkaian aktivasi enzim, pelepasan mediator, ekstrasvasi cairan, dan perbaikan jaringan (Vane dan Botting, 1995). Tanda umum inflamasi dapat dicirikan oleh pembengkakan, kemerahan, panas, nyeri, dan gangguan fungsi (Ammon, *et al.*, 1993). Karena adanya gangguan fungsi menyebabkan sel mengalami kerusakan.

Pada sel yang rusak terjadi aktivasi enzim fosfolipase A2 yang bertanggungjawab pada pembentukan asam arakhidonat, yang merupakan prekursor dari beberapa mediator inflamasi. Asam arakhidonat yang terbentuk selanjutnya diubah menjadi senyawa mediator melalui dua jalur utama yaitu jalur lipoksigenase dan jalur siklooksigenase.

Siklooksigenase merupakan enzim terikat membran yang telah ditemukan dalam retikulum endoplasmik dan membran inti. Siklooksigenase bekerja pada dua reaksi yaitu memasukkan endoperoxid pada C9 dan C11 dan memasukkan gugus hidroperoksida pada C15.

Hasil dari jalur siklooksigenase adalah suatu prostaglandin endoperoxida (PGG2), yang selain mengandung gugus peroksi, juga mengandung satu gugus hidroperoksi. Selanjutnya gugus hidroperoksi direduksi membentuk gugus alkohol pada C15, menghasilkan produk PGH2. Dari PGH2 selanjutnya terbentuk senyawa prostaglandin dalam berbagai jaringan, tromboksan (TXA2) dalam trombosit dan prostasiklin (PGI2) dalam endotel pembuluh darah. Pada beberapa sel, terutama trombosit, tidak semua PGH2 yang dibentuk diubah menjadi prostaglandin-prostaglandin. Beberapa PGH2 dialihkan ke hasil pemecahan 17-atom karbon, 12-L-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienoat (HHT). Tiga atom karbon yang tersisa dari PGH2 dilepaskan sebagai malondialdehid (MDA) pada reaksi ini.

Penghambatan enzim siklooksigenase diklasifikasikan dalam tiga kategori yaitu penghambatan kompetitif, penghambatan Inaktivasi tak terbalikkan (irreversibel) bergantung waktu dan penghambatan non

yang mempunyai struktur mirip dengan substrat dan dapat berikatan dengan sisi aktif siklooksigenase namun tidak menghasilkan produk. Jadi pada penghambatan kompetitif inhibitor berlomba dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif dari enzim tersebut. Ciri penghambatan kompetitif adalah penghambatan yang dapat dibalikkan dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Penghambatan tak terbalikkan (irreversibel) bergantung waktu adalah inaktivasi siklooksigenase sedemikian sehingga produk tidak dapat terbentuk, sampai enzim yang baru disintesis kembali dan terdapat dalam jaringan. Penghambatan jenis ini bereaksi dengan atau merusak gugus fungsional pada sisi aktif enzim yang penting bagi aktivitas katalitiknya. Penghambatan non kompetitif pada enzim siklooksigenase melalui dua mekanisme. Mekanisme pertama inhibitor sama sekali tidak menempel pada pusat aktif melainkan pada beberapa gugus disekitarnya. Kemungkinan yang lain adalah inhibitor terikat secara tak terbalikkan pada satu dari gugus-gugus esensial sisi aktif. Inhibitor menempel dengan erat sehingga penambahan konsentrasi substrat tidak bisa untuk mengusir inhibitor dari sisi aktif (Lands, 1985)

Modifikasi struktur atau mensintesis senyawa analog dari suatu senyawa penuntun merupakan salah satu metode pengembangan obat yang dewasa ini banyak sekali digunakan.

Tiga dari sejumlah analog kurkumin yang telah disintesis oleh Sardjiman (1997) adalah Pentagamavunon-0 (PGV-0),  $C_{21}H_{20}O_5$ , Pentagamavunon-1 (PGV-1),  $C_{23}H_{24}O_3$  dan Heksagamavunon-1 (HGV-1),  $C_{24}H_{26}O_3$ . Aktivitas biologis dari ketiga analog kurkumin tersebut telah diteliti, diantaranya sebagai antioksidasi, anti-inflamasi, anti fungi (Sardjiman, 2000) dan kemampuan menghambat terhadap enzim glutation S-transferase (Tim Molnas, 2001).

Penelitian kemampuan menghambat dan sifat hambatan PGV-0, PGV-1 dan HGV-1 menggunakan plasma yang kaya trombosit sebagai sumber siklooksigenase. Besarnya kemampuan menghambat terhadap siklooksigenase dinyatakan dalam persentase hambatan dari inhibitor kadar 0,1, 5, 10, 15, dan 20 mM untuk PGV-0, dan 0,1, 5, 10 dan 15 mM untuk PGV-1 dan HGV-1 pada konsentrasi substrat 3 mM. Sifat hambatan terhadap siklooksigenase ditentukan dari kurva Lineweaver-Burk dari inhibitor kadar 0,5, 10, dan 15 mM untuk PGV-0 dan 0,5, 10 mM untuk PGV-1 dan HGV-1, dengan kadar substrat 1, 3, 5, 7, dan 9 mM. Konstanta  $K_i$  ditentukan dengan persamaan untuk penghambatan

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar MDA pada masing-masing perlakuan dihitung menggunakan kurva kalibrasi yang merupakan kurva antara larutan standar MDA dengan intensitas fluoresensi.

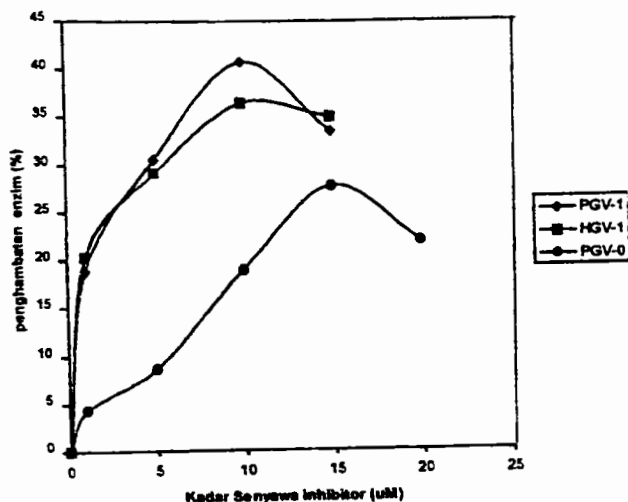
MDA setelah direaksikan dengan TBA akan membentuk kompleks MDA-TBA yang berwarna merah muda, dan dengan adanya sinar yang mengeksitasi elektron pada keadaan dasar ke keadaan transisi, MDA akan mengemisikan sinar.

Kemampuan menghambat analog kurkumin terhadap aktivitas siklooksigenase dinyatakan dengan persen hambatan. Tabel 1. menunjukkan persentase hambatan analog kurkumin.

Kurva hubungan antara ketiga kadar senyawa inhibitor (PGV-0, PGV-1 dan HGV-1) dengan persen hambatan dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Persentase hambatan analog kurkumin (inhibitor) pada kadar substrat (asam arakhidonat) 3 mM

Senyawa Inhibitor	Kadar Inhibitor ( $\mu$ M)	% Hambatan
PGV-0	0	0
	1	3,93
	5	9,32
	10	18,49
	15	27,66
	20	21,83
PGV-0	0	0
	1	18,92
	5	29,69
	10	40,32
	15	32,61
PGV-0	0	0
	1	19,51
	5	29,11
	10	36,39
	15	34,50



Gambar 1. Kurva hubungan antara kadar senyawa inhibitor dan penghambatan enzim

Pada penelitian ini digunakan tiga analog kurkumin yaitu PGV-0, dengan kadar 0,1,5,10,15, dan 20 mM, PGV-1 dan HGV-1 dengan kadar 0,1,5,10, dan 15 mM. Hasil penelitian menunjukkan ada kenaikan kemampuan menghambat enzim siklooksigenase pada kadar 0 sampai 15 mM untuk PGV-0 dan kadar 0 sampai 10 mM untuk PGV-1 dan HGV-1. Penambahan konsentrasi inhibitor lebih lanjut, yaitu 20 mM untuk PGV-0 dan 15 mM untuk PGV-1 dan HGV-1 justru menurunkan kemampuan menghambat terhadap enzim siklooksigenase. Ammon, *et al* (1993) meneliti kemampuan menghambat kurkumin terhadap aktivitas enzim siklooksigenase dalam mengubah asam arakhidonat menjadi 12-hidroksiheptadekatrienoat (12-HHT) menggunakan metode Ca-ionophor A23187. Kemampuan kurkumin dalam menghambat enzim siklooksigenase diperlihatkan pada kadar rendah, yaitu pada konsentrasi dibawah 10 mM, persentase pembentukan produk semakin menurun, seiring kenaikan kadar. Kenaikan konsentrasi kurkumin sampai 10 mM menaikkan kemampuan menghambat enzim siklooksigenase. Penelitian tersebut menunjukkan pola yang sama dengan penelitian ini. Pada kadar 15 mM untuk PGV-0 dan 10 mM untuk PGV-1 dan HGV-1 pembentukan produk MDA semakin menurun (diperlihatkan dari intensitas fluoresensi yang semakin menurun), sehingga menyebabkan persentase menghambat enzim siklooksigenase semakin tinggi. Pada konsentrasi inhibitor 15 mM untuk PGV-0 dan 10

Perbedaan antara senyawa PGV-0, PGV-1 dan HGV-1 terletak pada substituen pada kedua cincin aromatis dan bentuk siklisasi C-a gugus b-diketon. Untuk senyawa PGV-0 gugus b-diketon dari kurkumin diubah menjadi siklopentanon (siklisasi bentuk siklopentanon) tanpa ada substitusi pada cincin aromatis. Pada PGV-1, siklisasi C-a gugus b-diketon dalam bentuk siklopentanon, dan ada substitusi gugus dimetil pada kedua cincin aromatis. Pada senyawa HGV-1, siklisasi C-a gugus b-diketon dalam bentuk sikloheksanon, dan ada substitusi gugus dimetil pada kedua cincin aromatis,

Dari grafik tersebut terlihat bahwa PGV-0 persentase hambatannya lebih kecil dibandingkan dengan senyawa PGV-1. Persentase hambatan PGV-1 tidak begitu berbeda dibandingkan HGV-1, walaupun pada kadar tertentu yaitu 10 mM persentase PGV-1 sedikit lebih besar dari HGV-1.

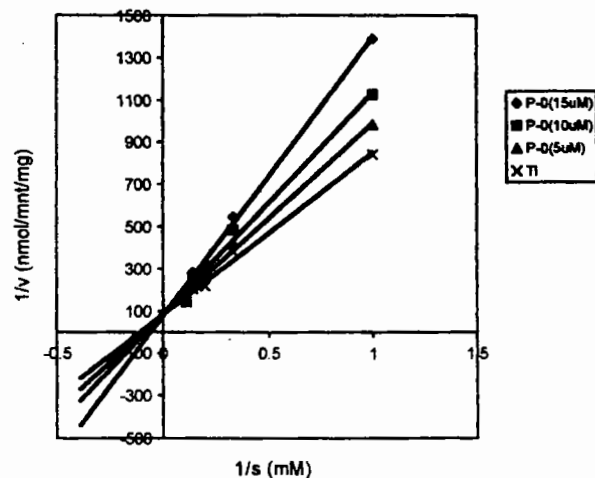
Senyawa PGV-0, tanpa substitusi gugus metil pada cincin aromatis,, mempunyai kemampuan menghambat enzim siklooksigenase lebih kecil dibandingkan senyawa PGV-1 dan HGV-1 dengan substitusi gugus metil pada cincin aromatis. Ini berarti bahwa substitusi gugus metil pada posisi ortho dan para pada cincin aromatis relatif meningkatkan kemampuan menghambat enzim siklooksigenase. Gugus metil yang terikat pada senyawa PGV-1 dan HGV-1 merupakan donor elektron yang lebih lemah dari pada gugus metoksi yang terikat pada senyawa PGV-0, akan tetapi gugus metili mempunyai halangan sterik terhadap gugus hidroksi fenolik lebih kecil dari pada gugus metoksi. Karena mempunyai halangan sterik yang lebih kecil, maka senyawa PGV-1 dan HGV-1 lebih mudah berikatan dengan sisi aktif enzim siklooksigenase dari pada senyawa PGV-0.

Perubahan bentuk siklisasi C-a gugus b-diketon, pada siklopentanon maupun sikloheksanon tidak begitu berpengaruh terhadap kemampuan menghambat terhadap enzim siklooksigenase, walaupun pada kadar 10 mM persentase hambatan PGV-1 sedikit lebih besar dari pada HGV-1.

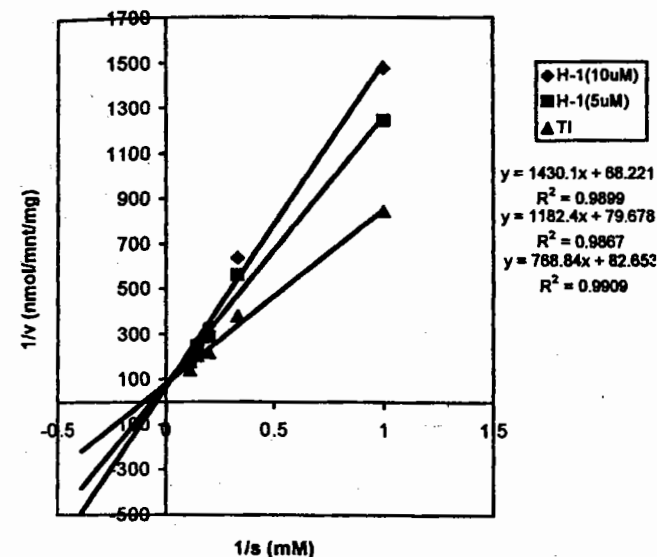
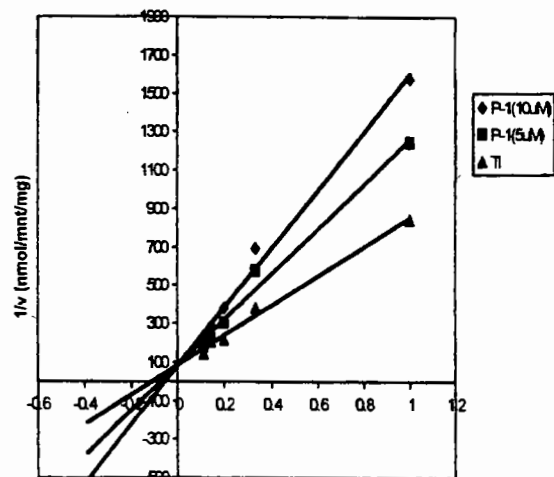
COX-1 merupakan enzim yang ada secara fisiologis, sedangkan COX-2 muncul karena aktivasi oleh kerusakan jaringan dan kadarnya bisa naik pada keadaan inflamasi (Vane dan Botting, 1995). Pada penelitian ini kemampuan menghambat enzim siklooksigenase dari ketiga senyawa analog kurkumin dikerjakan secara *in vitro* tanpa ada induksi inflamasi, sehingga diperkirakan ketiga analog kurkumin tersebut bekerja dengan menghambat enzim COX-1. Hasil penelitian

pemikiran bahwa kemungkinan ketiga analog kurkumin bekerja dengan tidak menghambat COX-1, tetapi melalui jalur lain, antara lain menghambat enzim COX-2 atau melalui penangkapan radikal bebas oksigen.

Sifat hambatan analog kurkumin terhadap aktivitas enzim siklooksigenase ditentukan menggunakan variasi kadar substrat dan kadar inhibitor tetap. Data yang diperoleh, selanjutnya dibuat kurva Lineweaver-Burk untuk menunjukkan sifat hambatannya. Gambar 2,3,4 di bawah ini menunjukkan kurva Line-weaver Burk oleh senyawa PGV-0, PGV-1 dan HGV-1.



Gambar 2. Kurva Lineweaver-Burk yang menunjukkan hambatan siklooksigenase oleh PGV-0 kadar 0, 5, 10, dan 15 mM



Gambar 4. Kurva Lineweaver-Burk yang menunjukkan hambatan siklooksigenase oleh HGV-1 kadar 0, 5, dan 10 mM

Dari kurva Lineweaver-Burk pada gambar 2,3, dan 4, kemudian dihitung nilai  $V_{max}$ ,  $K_m$  dan  $K_i$ . Nilai parameter  $V_{max}$ ,  $K_m$ , dan  $K_i$  dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai parameter  $V_{max}$ ,  $K_m$ , dan  $K_i$  dari PGV-0, PGV-1 dan HGV-1

Senyawa	Kadar ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/mnt/mg)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$K_i$ ( $\mu$ M)	Tipe Hambatan
Tanpa Inhibitor		0,0121	9,3020		
PGV-0	5	0,0119	10,776	31,515	Kompetitif
	10	0,0118	12,446	29,587	Kompetitif
	15	0,0135	17,842	16,339	Kompetitif
PGV-1	5	0,0114	13,468	11,164	Kompetitif
	10	0,0123	18,693	9,906	Kompetitif
HGV-1	5	0,0126	14,840	8,399	Kompetitif
	10	0,0147	20,963	7,977	Kompetitif

Dilihat dari kurva Lineweaver-Burk dan nilai parameter  $V_{max}$  yang hampir tidak berubah untuk semua analog kurkumin dan nilai  $K_m$  yang menunjukkan kenaikan seiring dengan kenaikan kadar inhibitor, maka sifat hambatan ketiga analog kurkumin adalah kompetitif. Struktur molekul analog kurkumin sedikit banyak mempunyai struktur yang hampir sama dengan struktur substrat (asam arakhidonat), paling tidak keduanya memiliki ikatan rangkap sehingga senyawa tersebut merupakan senyawa tak jenuh yang mudah teroksidasi

Kemiripan yang lain antara analog kurkumin dengan substrat adalah sifat keasaman pada gugus hidroksi. Hal ini bisa jadi merupakan pengaruh substrat atau inhibitor terhadap sisi aktif enzim. Analog kurkumin mempunyai gugus hidroksi yang lebih banyak dibandingkan asam arakhidonat, kemungkinan sisi aktif enzim mempunyai afinitas terhadap gugus hidroksi tersebut dan analog kurkumin lebih kuat menarik sisi aktif enzim tersebut.

Kemiripan struktur antara analog kurkumin dengan substrat menyebabkan terjadinya kompetisi antara analog kurkumin sebagai inhibitor dan asam arakhidonat sebagai substrat untuk memperebutkan sisi aktif enzim. Produk yang terjadi adalah kompleks enzim-inhibitor. Pada konsentrasi inhibitor optimum, sisi aktif enzim telah dijenuhi oleh inhibitor, sehingga penambahan konsentrasi inhibitor lebih lanjut tidak akan mempengaruhi ikatan enzim-inhibitor, meskipun terjadi benturan antara enzim dan inhibitor.

Bentuk siklisasi pada senyawa PGV-1 yaitu siklopentanon dan pada senyawa HGV-1 yaitu sikloheksanon, ternyata tidak begitu berpengaruh pada kemampuan menghambat terhadap enzim siklooksigenase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ammon, H.P.T., Safayhi, H., Mack, T. and Sabieraj, J., 1993, Mechanism of antiinflammatory action of curcumine and boswellic acids, *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier Scientific Publisher Ireland Ltd., 38, 113-119.
- Dewhirst, F. E., 1980, Structur activity relationship of inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds, *Prostaglandins*, University of Rochester, New York, 20, 209-222.
- Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D., Conney, A.H., 1991, Inhibitory effect of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis, *Cancer Research*, 51, 813-819.

- Lands, W.E.M., 1985, Mechanism of actions of anti inflammatory drugs, *Advances in Drugs Research*, 14, Academic Press, New York, 155-160.
- Sardjiman, S.S., Samhoedi, M., Hakim, L., van der Goot, H., Timmerman, H., 1997, 1,5 diphenyl-1-4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents, synthesis and structur-activity relationship, *Proceeding ISCP*, August 29-31, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia, 175-185.
- Sardjiman, 2000, Synthesis of some new series of curcumin analogues, antioxydative, antiinflammatory, antibacterial activities and qualitative-structure activity relationship, *Disertasi*, Universitas Gadjah Mada.
- Srimal, R.C., and Dhawan, B.N., 1973, Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non steroidal anti-inflammatory agent, *J. Pharm. Pharmacol.*, 25, 447-452.
- Tim Molnas, 2001, *Laporan Penelitian Bidang Farmakologi*, 3, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Vane, J.R., and Botting, R.M., 1995, Improve non-steroid anti-inflammatory drugs Cox-2 enzyme inhibitors, *Proceeding of a conference held*, The William Harvey Reserch Institute, Saint Bartholomeus's Hospital Medical College, London, United Kingdom, 1-6.